

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-057069

(43)Date of publication of application : 03.03.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C07H 21/02

C07H 21/04

C12N 9/06

C12Q 1/68

(21)Application number : 08-221465

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 22.08.1996

(72)Inventor : YOSHIBA HIROCHIKA  
IGARASHI YUMIKO

## (54) RICE PLANT DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE GENE

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject new gene, containing a specific base sequence, capable of coding a rice plant delta1-pyrroline-5-carboxylic acid synthase capable of catalyzing the proline synthesis required for water retention, etc., of plants and useful for breeding, etc., of salt and tolerant and drought resistant rice plants or plants.

**SOLUTION:** This new rice plant delta1-pyrroline-5-carboxylic acid synthase gene contains a base sequence and an amino acid sequence represented by the formula and is capable of breeding rice plants or useful crops having salt tolerance and drought resistance by transducing the gene of the delta1-pyrroline-5-carboxylic acid synthase useful for retaining water in plant bodies and determining the rate of proline synthesis into the plants. The gene is obtained by extracting an mRNA from a seedling of a rice plant, preparing a cDNA library by using the extracted mRNA according to a conventional method and screening the resultant cDNA library with a part of the delta1 pyrroline-5-carboxylic acid synthase gene as a probe.

```

ATG GCG AGC GTC AAG GTG GCG GAG CG
U TTC GCG AGC TTC GCG AGG CAG 148
MC AIA Ser Val Lys Met Cys Ala P
o Ser AGC Ser Phe Val Arg Ala
1
10
GTC AAG GCG GTC ATC ATC ACT GCA GT
T GTC TCT ACA GAA GAT GGA AGA 194
Val Lys Arg Val His His Thr Ala Va
1 Val Ser Arg Gln Arg Gly Arg
20 25
636
ACA CGA TCG ATC TTT CGA CGA CGT GG
U CAA GTG ATG AAT GGT GAG AAG 220
THR Arg Thr Ile Leu Arg Gly Ala G
y GTC Val Val Arg Gly Arg Lys
639
768
GAT GCG GCG TAC ACC CAT AAG AGT CT
T CCG GCG CAA TGA 2748
Asp Val Val Tyr Thr His Lys Ser Leu
CCTD LGL CCG AAA
705 710

```

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

18.07.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-57069

(43)公開日 平成10年(1998) 3月3日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/02			C 0 7 H 21/02	
21/04			21/04	B
C 1 2 N 9/06			C 1 2 N 9/06	Z
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 9 頁)				

(21)出願番号 特願平8-221465

(22)出願日 平成8年(1996) 8月22日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 吉羽 洋周

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会  
社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 五十嵐 由美子

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会  
社日立製作所基礎研究所内

(74)代理人 弁理士 高橋 明夫

(54)【発明の名称】 イネ・デルタ1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子

(57)【要約】

【課題】 これまで未知であったイネにおけるプロリン合成系の遺伝子であるデルタ1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子の構造を明らかにすること。

【解決手段】 高塩処理したイネ幼苗から作製したcDNAライブラリーをアラビドプシスのデルタ1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子cDNAをプローブにしてスクリーニングし、ポジティブクローンを得る。これらをサブクローニングし、制限酵素処理して長さを調べ、5'端及び3'端の塩基配列を調べ、イネにおけるデルタ1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素cDNAを含むクローンを得る。このクローンをシーケンスしホモロジー検索により先に単離されているアラビドプシス及びモスビーと74~75% (アミノ酸レベル) の高い相同性が見られるイネにおけるデルタ1-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子を得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1で特定される塩基配列及びアミノ酸配列を含むイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子。

【請求項2】配列番号1で特定される塩基配列及びアミノ酸配列を含むイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子とベクター断片とを結合させてなるファージ及び／又はプラスミド。

【請求項3】配列番号1で特定される塩基配列及びアミノ酸配列を含むイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子断片からなるイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子つり出し用プローブ。

【請求項4】配列番号1で特定される塩基配列及びアミノ酸配列を含むイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子構築用DNA。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、イネにおけるデルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子に関する。

## 【0002】

【従来の技術】植物が高塩ストレスを受けるとその体内にプロリンを蓄積することが塩生植物を含む幾つかの植物で知られている。これは、蓄積されたプロリンが植物体内の水分保持に役立っていると考えられている。植物におけるプロリンはイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素とデルターピロリン-5-カルボン酸レダクターゼの2つの酵素によってグルタミン酸から合成される。

【0003】上記の植物では、高塩ストレスや乾燥ストレスなどの水ストレス（水を吸収しにくい状態）を受けるとデルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素活性及びデルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子の発現レベルが上昇するが、デルターピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ活性及びデルターピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ遺伝子発現レベルはほとんど一定で、低いレベルにある。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】このことから、水ストレス時のプロリン合成には、デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素が律速となっていると考えられる（YoshidaらPlant J. 7:751-760(1995)）。

【0005】そのため、本遺伝子を過剰に発現させるような遺伝子操作を行えば、耐塩性や耐乾燥性をもったイネ及び有用作物を育種することが可能となる。従って、地球環境の悪化に伴って乾燥、半乾燥による塩類土壌の増加が今後益々予想されることから、上記のような耐性作物を育種することは、世界の食糧問題を解決する上で重要な役割をはたすものである。

【0006】デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素は、植物においてプロリン合成における中間物質、デルターピロリン-5-カルボン酸を合成する酵素であり、大腸菌などの原核生物では、ガンマーグルタミルキナーゼとグルタミルガンマーホスフェイトデヒドロゲナーゼという2つの酵素によりデルターピロリン-5-カルボン酸が合成される。つまり、植物のデルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素は大腸菌でいうガンマーグルタミルキナーゼとグルタミルガンマーホスフェイトデヒドロゲナーゼを合わせた2価酵素である（Hura Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9354-9358 (1992)）。

【0007】植物におけるデルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子は、これまでにモスピーーンとアラビドプシスから、そのcDNAが単離されているだけで、単子葉植物からは、全く単離されていない。従って、本発明のようにイネのデルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子の単離は、全く未知であり、新規な技術的解明を初めて果たしたものである。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、このようなイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素の重要性に注目し行なわれたものであり、遺伝子操作によってこの酵素のコントロールを行なうという新規技術課題を設定し、その課題の解決に成功したものである。すなわち、本発明者らは、従来知られていない上記技術課題を新たに設定し、各方面から研究を行ない、イネ幼苗の組織からの遺伝子単離について検討をかさねた結果、mRNAの逆転写によって得られるcDNAライブラリーからイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子の全長をコードしているcDNAを単離することに成功し本発明を完成した。

## 【0009】

【発明の実施の形態】本発明はイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子（cDNA）に関するものであり、そのDNA配列は配列番号1の配列表に示される。本遺伝子は、2549塩基対からなり、一つのオープンリーディングフレームと3'端にはポリAデニレーションのためのAATAA配列をもっていた。また、本発明はイネ・デルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子（cDNA）を含むファージ、それより由来するプラスミドに関するものである。

【0010】本発明を実施するには、まず最初にイネ幼苗からmRNAを抽出し、抽出したmRNAを用いてcDNAを調製する。このcDNAをプラスミド又はファージからなるベクターと結合して宿主微生物に導入し組換え体DNAを調製する。この組換え体DNAが導入された形質転換微生物は、アラビドプシスからのデルターピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子をプローブに用いる等して常法に従ってスクリーニングし、目的と

する形質転換体を選び出す。得られた形質転換体から目的とするプラスミドを単離し、必要があれば適当な制限酵素で切断しプラスミドベクターにサブクローニングしてクローン化する。

【0011】このクローンDNAを用いて形質転換体を調製し、培養することでデルター・ピロリン-5-カルボン酸あるいはプロリンを培養物から大量に得ることができる。

【0012】本発明によって調製したイネ・デルター・ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子は、強力なあるいは根特異的に発現するようなプロモーターの下流に連結しプラスミドと結合した後、エレクトロポレーションやアグロバクテリウム感染法等、常法にしたがってイネや有用作物の細胞に導入し、この細胞から植物体を再生すればよい。これによってイネ・デルター・ピロリン-5-カルボン酸合成酵素を過剰に生産するイネや有用作物は、その体内あるいは根等の特異的な組織にデルター・ピロリン-5-カルボン酸ひいてはプロリンを蓄積することになる。

【0013】以下、本発明を実施例によってさらに詳しく述べるが、本発明はこれに限られたものではない。尚、下記実施例において特に断らない限り、各操作は Sambrook から Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. に記載した方法に基づいて行なった。

#### 【0014】遺伝子の同定

まず、イネ品種「秋晴」の幼苗より以下の手順により cDNA ライブラリーを作製した。即ち、発芽後 2 週間経過した幼苗 10 g よりグアニジンチオシアネート/CsCl 法により全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA よりオリゴ dT ラテックス (宝酒造社) により mRNA を分離した。mRNA は全 RNA の約 1.2% の収量であった。mRNA より cDNA の合成は市販の合成キット (ストラタジーン社製) を使用した。合成した cDNA はラムダザップ II (ストラタジーン社製) というラムダファージベクターに組み込み、大腸菌に感染させることにより cDNA ライブラリーを得た。

【0015】次に、先に単離されたアラビドプシスのデルター・ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子 cDNA をプローブにしてブラックハイブリダイゼーション法によって約 30 個のポジティブクローンを得た。これらのうち 10 個のクローンをブルースクリプトにサブクローニングし、これら全てについて制限酵素処理、5' 端及び 3' 端の一部をサイクルシーケンス法により塩基配列を決定することでデルター・ピロリン-5-カルボン酸合成酵素の cDNA の全長を含むと思われる 1 つの\*

#### 配列

```
GCGGCTGCGG CGGCAAGGCG GCGAGACGTG G
GAGAGGGAT TTACAGGTAG AGGGAGAGGG 60
TGGAGGAGGA GAGGCTGAGG CTAGGAAGCG G
TTTCGCC 98
```

\* クローンを得た。このクローンを DNA デリジョンキットを用いて約 250 bp ずつ異なるクローンを得た。これらのクローンからプラスミド DNA を抽出し、調製してサイクルシーケンス法により cDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した cDNA は、ホモロジー解析、ノーザン解析等により既に単離されているアラビドプシス及びモスビーンのデルター・ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子とアミノ酸レベルで 74~75% の高い相同性が見られたことからイネにおけるデルター・ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子と同定した。得られた塩基配列とアミノ酸配列を配列番号 1 の配列表に示した。

#### 【0016】

【発明の効果】本発明によって初めてイネ・デルター・ピロリン-5-カルボン酸合成酵素遺伝子の構造が解明された。

【0017】したがって、本遺伝子を植物体において増強させることにより、プロリンを蓄積させることができ植物体に耐塩性あるいは耐乾性を付与することができる。したがって、このようなイネあるいは有用作物を育種すれば塩類の集積した土壌や砂漠化した土壌において作物の栽培が可能となり食糧生産を向上させることが期待できる。また、発展途上国における人口増加にも対処できることが大いに期待される。

#### 【0018】

##### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2549

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源:

生物名: オリザ サチヴァ (Orizawa sativa)

株名: cv. 秋晴

組織の種類: 全植物体

ライブラリー名:

クローン名:

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 99..2249

特徴を決定した方法: P

特徴を表す記号: mat peptide

存在位置: 99..2249

特徴を決定した方法: S

	5						6		
	ATG	GCG	AGC	GTC	AAG	GTG	GGC	GAC	CC
G	TCC	CGG	AGC	TTC	GTG	AGG	GAC		146
	Met	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Gly	Asp	Pr
o	Ser	Arg	Ser	Phe	Val	Arg	Asp		
	1				5				
	10					15			
	GTG	AAG	CGC	GTC	ATC	ATC	ACT	GCA	GT
T	GTC	TCC	AGA	CAA	GAT	GGA	AGA		194
	Val	Lys	Arg	Val	Ile	Ile	Thr	Ala	Va
l	Val	Ser	Arg	Gln	Asp	Gly	Arg		
				20					25
				30					
	TTG	GCT	TTG	GGC	AGG	GTT	GGA	GCT	CT
G	TGC	GAG	CAG	GTT	AAG	GAA	CTG		242
	Leu	Ala	Leu	Gly	Arg	Val	Gly	Ala	Le
u	Cys	Glu	Gln	Val	Lys	Glu	Leu		
			35					40	
			45						
	AAC	TCT	TTA	GGA	TAC	GAA	GTG	ATT	TT
G	GTC	ACC	TCA	GGT	GCT	GTT	GGA		290
	Asn	Ser	Leu	Gly	Tyr	Glu	Val	Ile	Le
u	Val	Thr	Ser	Gly	Ala	Val	Gly		
		50					55		
			60						
	GTG	GGG	CGA	CAG	CGA	CTT	AGG	TAC	CG
G	AAG	CTT	GTC	AAT	AGC	AGC	TTT		338
	Val	Gly	Arg	Gln	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ar
g	Lys	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Phe		
	65					70			
		75					80		
	GCT	GAT	CTG	CAA	AAG	CCA	CAG	ATG	GA
G	TTA	GAT	GGA	AAG	GCT	TGT	GCC		386
	Ala	Asp	Leu	Gln	Lys	Pro	Gln	Met	Gl
u	Leu	Asp	Gly	Lys	Ala	Cys	Ala		
				85					
		90				95			
	GCT	GTT	GGT	CAG	AGT	GGA	CTG	ATG	GC
T	CTT	TAC	GAT	ATG	TTG	TTT	AAC		434
	Ala	Val	Gly	Gln	Ser	Gly	Leu	Met	Al
a	Leu	Tyr	Asp	Met	Leu	Phe	Asn		
				100					10
5					110				
	CAA	CTG	GAT	GTC	TCG	TCA	TCT	CAA	CT
T	CTT	GTC	ACC	GAC	AGT	GAT	TTT		482
	Gln	Leu	Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Gln	Le
u	Leu	Val	Thr	Asp	Ser	Asp	Phe		
			115					120	
			125						
	GAG	AAC	CCA	AAG	TTC	CGG	GAG	CAA	CT
C	ACT	GAA	ACT	GTT	GAG	TCA	TTA		530

7							8		
	Glu	Asn	Pro	Lys	Phe	Arg	Glu	Gln	Le
u	Thr	Glu	Thr	Val	Glu	Ser	Leu		
		130					135		
			140						
	TTA	GAT	CTT	AAA	GTT	ATA	CCA	ATA	TT
T	AAT	GAA	AAT	GAT	GCC	ATC	AGC		578
	Leu	Asp	Leu	Lys	Val	Ile	Pro	Ile	Ph
e	Asn	Glu	Asn	Asp	Ala	Ile	Ser		
	145					150			
		155					160		
	ACT	AGA	AAG	GCT	CCA	TAT	GAG	GAT	TC
A	TCT	GGT	ATA	TTC	TGG	GAT	AAT		626
	Thr	Arg	Lys	Ala	Pro	Tyr	Glu	Asp	Se
r	Ser	Gly	Ile	Phe	Trp	Asp	Asn		
					165				
	170					175			
	GAC	AGT	TTA	GCA	GGA	CTG	TTG	GCA	CT
G	GAA	CTG	AAA	GCT	GAT	CTC	CTT		674
	Asp	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Le
u	Glu	Leu	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu		
				180					18
5					190				
	ATT	CTG	CTC	AGT	GAT	GTG	GAT	GGG	TT
G	TAT	AGT	GGT	CCA	CCA	AGT	GAA		722
	Ile	Leu	Leu	Ser	Asp	Val	Asp	Gly	Le
u	Tyr	Ser	Gly	Pro	Pro	Ser	Glu		
			195					200	
			205						
	CCA	TCA	TCA	AAA	ATC	ATA	CAC	ACT	TA
T	ATT	AAA	GAA	AAG	CAT	CAG	CAA		770
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ile	Ile	His	Thr	Ty
r	Ile	Lys	Glu	Lys	His	Gln	Gln		
		210					215		
		220							
	GAA	ATC	ACT	TTT	GGA	GAC	AAA	TCT	CG
T	GTA	GGT	AGA	GGA	GGC	ATG	ACA		818
	Glu	Ile	Thr	Phe	Gly	Asp	Lys	Ser	Ar
g	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Met	Thr		
	225					230			
		235					240		
	GCA	AAA	GTG	AAG	GCT	GCT	GTC	TTG	GC
T	TCA	AAT	AGC	GGC	ACA	CCT	GTG		866
	Ala	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Al
a	Ser	Asn	Ser	Gly	Thr	Pro	Val		
					245				
	250					255			
	GTT	ATT	ACA	AGT	GGG	TTT	GAA	AAT	CG
G	AGC	ATT	CTT	AAA	GTT	CTT	CAT		914
	Val	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Glu	Asn	Ar
g	Ser	Ile	Leu	Lys	Val	Leu	His		

9				10					
260				26					
270									
5	GGG	GAA	AAA	ATT	GGT	ACT	CTC	TTT	CA
C	AAG	AAT	GCG	AAT	TTG	TGG	GAA		962
	Gly	Glu	Lys	Ile	Gly	Thr	Leu	Phe	Hi
s	Lys	Asn	Ala	Asn	Leu	Trp	Glu		
275				280					
285									
G	TCA	TCT	AAG	GAT	GTT	AGT	ACT	CGT	GA
	ATG	GCT	GTT	GCC	GCA	AGA	GAT		1010
u	Ser	Ser	Lys	Asp	Val	Ser	Thr	Arg	Gl
	Met	Ala	Val	Ala	Ala	Arg	Asp		
290				295					
300									
A	TGT	TCA	AGG	CAT	CTA	CAG	AAT	TTG	TC
	TCA	GAG	GAA	CGA	AAA	AAG	ATA		1058
r	Cys	Ser	Arg	His	Leu	Gln	Asn	Leu	Se
	Ser	Glu	Glu	Arg	Lys	Lys	Ile		
305				310					
315				320					
G	TTG	CTA	GAT	GTT	GCA	GAT	GCT	TTG	GA
	GCA	AAT	GAG	GAT	TTA	ATA	AGG		1106
u	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Gl
	Ala	Asn	Glu	Asp	Leu	Ile	Arg		
325				335					
G	TCT	GAG	AAT	GAA	GCT	GAT	GTA	GCT	GC
	GCC	CAA	GTT	GCT	GGA	TAT	GAG		1154
a	Ser	Glu	Asn	Glu	Ala	Asp	Val	Ala	Al
	Ala	Gln	Val	Ala	Gly	Tyr	Glu		
340				34					
350									
5	AAG	CCT	TTG	GTT	GCT	AGA	TTG	ACT	AT
A	AAA	CCA	GGA	AAG	ATA	GCA	AGC		1202
	Lys	Pro	Leu	Val	Ala	Arg	Leu	Thr	Il
e	Lys	Pro	Gly	Lys	Ile	Ala	Ser		
355				360					
365									
A	CTT	GCA	AAA	TCT	ATT	CGT	ACC	CTT	GC
	AAT	ATG	GAA	GAC	CCT	ATA	AAC		1250
a	Leu	Ala	Lys	Ser	Ile	Arg	Thr	Leu	Al
	Asn	Met	Glu	Asp	Pro	Ile	Asn		
370				375					
380									
T	CAG	ATA	CTT	AAA	AAG	ACA	GAG	GTT	GC
	GAT	GAT	TTA	GTT	CTT	GAG	AAA		1298
	Gln	Ile	Leu	Lys	Lys	Thr	Glu	Val	Al
a	Asp	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Lys		
385				390					
395				400					



	11							12		
A u	ACA	TCT	TGC	CCA	TTA	GGT	GTT	CTC	TT	
	ATT	GTT	TTT	GAG	TCC	CGA	CCT		1346	
	Thr	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Val	Leu	Le	
	Ile	Val	Phe	Glu	Ser	Arg	Pro			
					405					
G u		410						415		
	GAT	GCC	TTG	GTT	CAG	ATT	GCA	TCT	TT	
	GCA	ATT	CGA	AGT	GGT	AAT	GGT		1394	
	Asp	Ala	Leu	Val	Gln	Ile	Ala	Ser	Le	
	Ala	Ile	Arg	Ser	Gly	Asn	Gly			42
				420						
5 T a					430					
	CTT	CTC	CTA	AAA	GGT	GGA	AAA	GAA	GC	
	ATC	AGA	TCA	AAC	ACG	ATA	TTG		1442	
	Leu	Leu	Leu	Lys	Gly	Gly	Lys	Glu	Al	
	Ile	Arg	Ser	Asn	Thr	Ile	Leu			
				435					440	
T o				445						
	CAT	AAG	GTT	ATA	ACT	GAT	GCT	ATT	CC	
	CGT	AAT	GTT	GGT	GAA	AAA	CTT		1490	
	His	Lys	Val	Ile	Thr	Asp	Ala	Ile	Pr	
	Arg	Asn	Val	Gly	Glu	Lys	Leu			
				450				455		
G u			460							
	ATT	GGC	CTT	GTT	ACA	ACT	AGA	GAT	GA	
	ATC	GCA	GAT	TTG	CTA	AAG	CTT		1538	
	Ile	Gly	Leu	Val	Thr	Thr	Arg	Asp	Gl	
	Ile	Ala	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu			
				465				470		
A o		475						480		
	GAT	GAT	GTC	ATT	GAT	CTT	GTC	ACT	CC	
	AGA	GGA	AGT	AAT	AAG	CTT	GTC		1586	
	Asp	Asp	Val	Ile	Asp	Leu	Val	Thr	Pr	
	Arg	Gly	Ser	Asn	Lys	Leu	Val			
				485						
T e		490						495		
	TCT	CAA	ATC	AAG	GCG	TCA	ACT	AAG	AT	
	CCT	GTT	CTT	GGG	CAT	GCT	GAT		1634	
	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Ser	Thr	Lys	Il	
	Pro	Val	Leu	Gly	His	Ala	Asp			
				500					50	
5 A s					510					
	GGT	ATA	TGC	CAC	GTA	TAT	ATT	GAC	AA	
	TCA	GCT	GAC	ATG	GAT	ATG	GCA		1682	
	Gly	Ile	Cys	His	Val	Tyr	Ile	Asp	Ly	
	Ser	Ala	Asp	Met	Asp	Met	Ala			
				515				520		
T				525						
	AAA	CTT	ATT	GTA	ATG	GAT	GCA	AAA	AC	
	GAT	TAC	CCA	GCA	GCC	TGC	AAT		1730	

13										14	
	Lys	Leu	Ile	Val	Met	Asp	Ala	Lys	Th		
r	Asp	Tyr	Pro	Ala	Ala	Cys	Asn				
		530						535			
			540								
	GCA	ATG	GAG	ACC	TTA	CTA	GTT	CAT	AA		
G	GAT	CTT	ATG	AAG	AGT	CCA	GGC		1778		
	Ala	Met	Glu	Thr	Leu	Leu	Val	His	Ly		
s	Asp	Leu	Met	Lys	Ser	Pro	Gly				
	545					550					
		555						560			
	CTT	GAC	GAC	ATA	TTA	GTA	GCA	CTA	AA		
A	ACA	GAA	GGA	GTT	AAT	ATT	TAT		1826		
	Leu	Asp	Asp	Ile	Leu	Val	Ala	Leu	Ly		
s	Thr	Glu	Gly	Val	Asn	Ile	Tyr				
					565						
	570					575					
	GGT	GGA	CCT	ATT	GCG	CAC	AAA	GCT	CT		
G	GGA	TTT	CCA	AAA	GCT	GTT	TCA		1874		
	Gly	Gly	Pro	Ile	Ala	His	Lys	Ala	Le		
u	Gly	Phe	Pro	Lys	Ala	Val	Ser				
				580					58		
5					590						
	TTT	CAT	CAT	GAG	TAT	AGT	TCT	ATG	GC		
C	TGC	ACT	GTT	GAG	TTT	GTT	GAT		1922		
	Phe	His	His	Glu	Tyr	Ser	Ser	Met	Al		
a	Cys	Thr	Val	Glu	Phe	Val	Asp				
			595					600			
			605								
	GAT	GTT	CAA	TCA	GCA	ATT	GAC	CAT	AT		
T	CAT	CGT	TAT	GGA	AGT	GCT	CAT		1970		
	Asp	Val	Gln	Ser	Ala	Ile	Asp	His	Il		
e	His	Arg	Tyr	Gly	Ser	Ala	His				
		610					615				
			620								
	ACA	GAT	TGT	ATC	GTC	ACT	ACA	GAT	GA		
T	AAG	GTA	GCA	GAG	ACT	TTT	CTA		2018		
	Thr	Asp	Cys	Ile	Val	Thr	Thr	Asp	As		
p	Lys	Val	Ala	Glu	Thr	Phe	Leu				
	625					630					
		635						640			
	CGC	AGA	GTT	GAT	AGT	GCT	GCT	GTA	TT		
T	CAT	AAT	GCA	AGT	ACG	AGA	TTC		2066		
	Arg	Arg	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Val	Ph		
e	His	Asn	Ala	Ser	Thr	Arg	Phe				
					645						
	650					655					
	TCT	GAT	GGG	GCT	CGT	TTT	GGA	TTG	GG		
T	GCT	GAG	GTT	GGC	ATA	AGC	ACA		2114		
	Ser	Asp	Gly	Ala	Arg	Phe	Gly	Leu	Gl		
y	Ala	Glu	Val	Gly	Ile	Ser	Thr				

	15						16	
			660				66	
5				670				
	GGG	CGT	ATC	CAT	GCC	CGT	GGA	CCA GT
G	GGT	GTT	GAA	GGT	CTC	TTA	ACT	2162
	Gly	Arg	Ile	His	Ala	Arg	Gly	Pro Va
l	Gly	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Thr	
			675					680
			685					
	ACA	CGA	TGG	ATC	TTG	CGA	GGA	CGT GG
G	CAA	GTG	GTG	AAT	GGT	GAC	AAG	2210
	Thr	Arg	Trp	Ile	Leu	Arg	Gly	Arg Gl
y	Gln	Val	Val	Asn	Gly	Asp	Lys	
			690					695
			700					
	GAT	GTC	GTG	TAC	ACC	CAT	AAG	AGT CT
T	CCT	TTG	CAA	TGA				2249
	Asp	Val	Val	Tyr	Thr	His	Lys	Ser Le
u	Pro	Leu	Gln	***				
			705					710
			715					
	GGTCAAATGC	TCCTTTTAGC	CTGTTTCAGGA	G				
	TAGGTGAAT	ATCCTTTTAA	GAATGGATTG	2309				
	ACTACTTTAT	TTTGTCATCT	TGTACAAGCA	T				
	CTTATTGCG	GCATTCCGAT	GGATTATTGA	2369				
	TTTTGGGGGT	TCCCACTTTC	AAATGTGACA	C				
	CAAAAATAA	ATTCATCAGT	TCTGAGAGCA	2429				
	AGATTTTGGG	GGTTCAGCTT	CTCCATGTAA	T				
	AAGTAAATT	CAGTTCTGAG	AACTTGTGTA	2489				
	CCAACGCGCT	ATGTTGCTTG	TAATGAGCGA	T				
	ACTAACATC	TGTGATTGCA	CATATACTAA	2549				